

**(12)** **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

**(21)** Anmeldenummer: **89114710.0**

**(51)** Int. Cl.4: **C07K 1/04 , B01D 19/00**

**(22)** Anmeldetag: **09.08.89**

**(30)** Priorität: **23.08.88 DE 3828576**

**(43)** Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**28.02.90 Patentblatt 90/09**

**(84)** Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE**

**(71)** Anmelder: **BOEHRINGER INGELHEIM KG**  
**Postfach 200**  
**D-6507 Ingelheim am Rhein(DE)**  
**(84)** **BE CH DE ES FR GR IT LI LU NL SE AT**

Anmelder: **BOEHRINGER INGELHEIM**  
**INTERNATIONAL GmbH**  
**Postfach 20**  
**D-6507 Ingelheim am Rhein(DE)**  
**(84)** **GB**

**(72)** Erfinder: **Schnorrenberg, Gerd, Dr.**  
**Ernst-Ludwig-Strasse 66a**  
**D-6535 Gau-Algesheim(DE)**  
Erfinder: **Knapp, Wilhelm**  
**Winzerstrasse 5**  
**D-6537 Gensingen(DE)**

**(54)** Verfahren und Vorrichtung zur vollautomatischen simultanen Synthese mehrerer Polypeptide.

**(57)** Verfahren und Vorrichtung zur vollautomatischen simultanen Synthese mehrerer Polypeptide, wobei bis zu 96 verschiedene Polypeptide in einem Pipettier-Roboter nach der Festphasensynthese-Methode synthetisiert werden.

BEST AVAILABLE COPY

EP 0 355 582 A2

## Verfahren und Vorrichtung zur vollautomatischen simultanen Synthese mehrerer Polypeptide

Für die schnelle Evaluierung von Struktur-Wirkungsbeziehungen an biologisch aktiven Peptiden durch Rezeptor-Bindungs-Studien und die schnelle Epitop-Ermittlung für die Immunologie bei Peptiden und Proteinen werden relativ kleine Mengen (unter je 20 mg) einer Vielzahl von Peptiden benötigt. Die Herstellung dieser Peptide erfolgt zweckmäßig nach der Festphasenpeptidsynthese. Diese Synthese basiert auf der von R.B. Merrifield entwickelten Methode (G. Barany, R.B. Merrifield in *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 2, 3-284 (1980), Hrsg. Gross, Meienhofer Academic Press, New York), bei der die Peptidkette schrittweise aufgebaut wird. Die Syntheseschritte können wie folgt zusammengefaßt werden:

- a) Binden der ersten Aminosäure der Peptidkette über eine Ankergruppe an einen polymeren Träger,
- b) schrittweises Ankondensieren der übrigen Aminosäuren der Peptidkette,
- 10 c) Zwischenschritte zwischen den einzelnen Kondensationen bestehend aus Waschen, Abspalten von Schutzgruppen und Neutralisieren,
- d) gewünschtenfalls acylieren endständiger Aminogruppen,
- e) Abspalten des Peptids vom Träger.

Bei dieser Peptidsynthese muß mit einer Syntheszeit von bis zu 18 Stunden, meist bis zu 4 Stunden pro Aminosäure gerechnet werden. (Die einzelnen Kondensationen benötigen meist 1 bis 2 Stunden Reaktionszeit; zwischen den Kondensationen sind in der Regel etwa 10 Zwischenschritte erforderlich, für die je ca. 2 bis 15 Minuten gerechnet werden müssen.) Die Herstellung von Peptiden bestehend aus einer größeren Anzahl von Aminosäuren ist somit sehr langwierig, arbeitsintensiv und teuer.

Für die Festphasensynthese analoger Peptide ist von R. A. Houghten (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 82, pp. 5131-5135 August 1985, Immunology) eine Methode beschrieben worden. Danach wird der polymere Träger für die Synthese in Portionen von je 50-100 mg in kleine Poröse Polypropylenbeutel gefüllt, die Beutel werden zugeschmolzen, die in den Synthesen einheitlichen Zwischenschritte (Waschen, Neutralisieren, Abspalten von Schutzgruppen) werden an allen Beuteln gleichzeitig in einem gemeinsamen Reaktionsgefäß ausgeführt die einzelnen Kondensationen werden getrennt ausgeführt. Die Methode kann 25 manuell oder teilweise automatisiert unter Verwendung eines Peptidsynthesizers ausgeführt werden.

Der Nachteil der beschriebenen Methode liegt darin, daß die Handhabung der Beutel etwas umständlich ist, daß die Beutel nicht wieder verwendet werden können, daß für die Kondensationen der verschiedenen Peptide die Beutel voneinander getrennt werden müssen und keine Kontrollproben während der ganzen Synthese entnommen werden können.

30 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und eine Vorrichtung bereit zu stellen, die die automatische simultane Synthese mehrerer Polypeptide ermöglicht und die oben genannten Nachteile vermeidet.

Die Aufgabe wird gelöst, indem die bereits erwähnte Festphasensynthese-Methode so abgewandelt wird, daß sie mit Hilfe eines entsprechend angepaßten Pipettier-Roboters ausgeführt werden kann. Pipettier-Roboter sind bis jetzt für Serienanalysen verwendet worden. Zum Beispiel ist ein Pipettier-Roboter der Firma TECAN, RSP 5052, verwendbar.

Pipettier-Roboter weisen folgende äußere Bestandteile auf: Mindestens einen Arm mit Dosierpipette, eine Halterung mit Vorratsgefäßen sowie eine Mikrotiterplatte die bis zu 96 Wells enthalten kann. Der Arm des Roboters bringt die Reagenzien aus den Vorratsgefäßen in die jeweiligen Wells der Mikrotiterplatte ein und saugt bei Bedarf Flüssigkeiten aus den Wells ab. Die Kanüle der Dosierpipette kann auch so 40 ausgebildet sein, daß sie durch eine von oben nach unten laufende Trennwand in zwei Teile geteilt ist. (Durch diese geteilte Kanüle ist es möglich, zwei verschiedene Zudosierungen oder eine Zudosierung und eine Absaugung mit einem Arm auszuführen) Der Arbeitsablauf des Gerätes wird durch ein Computerprogramm gesteuert.

45 Die Festphasenpeptidsynthese erfolgt erfindungsgemäß in einem solchen Pipettier-Roboter wie folgt: In den Wells einer Mikrotiterplatte wird Trägermaterial (vorzugsweise granuliertes Trägermaterial) vorgelegt. Das Trägermaterial kann mit dem Anfangsteil des jeweils gewünschten Peptids beladen sein. Die für die Reaktionen und Waschschrte benötigten Flüssigkeiten werden in den Vorratsgefäßen des Gerätes bereitgestellt. Soll am Ende der Synthese das Peptid vom Träger getrennt werden und/oder sollen freie 50 Aminogruppen acyliert werden, so sind auch für diese Reaktionen die erforderlichen Reagenzien in den Vorratsgefäßen vorzubereiten. Aus den benötigten Reaktionszeiten ergibt sich, daß es zweckmäßig ist, eine Mikrotiterplatte zu verwenden, die nicht mehr als 96 Wells enthält. Dementsprechend können in einem Programmablauf maximal 96 verschiedene Polypeptide synthetisiert werden. Entsprechend dem Programm, das der Synthese dieser Peptide angepaßt worden ist, bringt der Roboter die Reagenzien und Waschflüssigkeiten in die einzelnen Wells ein und saugt nach der entsprechenden Verweilzeit die über dem Träger

stehende Flüssigkeit jeweils ab.

Anhand des zweiarmigen Pipettier-Roboters RSP 5052 der Firma TECAN wird das Verfahren und die nötige Anpassung des Gerätes an das Verfahren näher erläutert. Die Anwendung des Verfahrens ist jedoch nicht auf dieses Gerät beschränkt. Pipettier-Roboter anderer Bauart, insbesondere auch ein- oder mehrarmige Roboter können gemäß der vorliegenden Erfindung für das Verfahren angepaßt werden.

Es wird eine Microtiterplatte mit 96 Wells gewählt. Ein Well faßt z. B. 10 mg Harz, das mit einer Aminosäure beladen sein kann, und etwas mehr als 300 µl Flüssigkeit. Diese Menge Harz entspricht etwa 5 µmol Aminosäure bzw. ist für die Herstellung von etwa 5 µmol Peptid geeignet. Übliche Trägermaterialien auf Polystyrol- oder Polyacrylamidbasis sind verwendbar. Es ist zweckmäßig, Peptide aufzubauen, die maximal 20 Aminosäuren enthalten. Die dafür benötigten Reagenzlösungen und Waschflüssigkeiten werden in den dafür vorgesehenen Vorratsgefäßen vorbereitet. Arm 1 des Gerätes ist mit einer Dosierpipette versehen. Arm 2 mit einer Absaugkanüle mit Spülvorrichtung. Diese Spülvorrichtung ist vorzugsweise mit einem separat stehenden Vorratsgefäß für das verwendete Lösungsmittel verbunden. Die Synthese erfolgt nach dem im angeschlossenen PC vorgegebenen Programm.

Mit Arm 1 erfolgt die Zudosierung sämtlicher Reagenzlösungen, die aus offenen Vorratsgefäßen entnommen werden. Bevor die Dosierpipette von einer Reagenzlösung zu einer anderen wechselt, wird die Dosierpipette in einer speziellen Spülposition mit Lösungsmittel gespült. Mit Arm 2 erfolgt über eine mit einem Filter versehene Kanüle das Absaugen der Reagenz- und Waschflüssigkeiten. Zur Verhinderung von Harzverlusten und Kontaminationen der benachbarten Wells wird die Außenseite dieser Kanüle nach jedem Absaugvorgang mit Lösungsmittel über eine an der Kanüle seitlich angebrachte Zuleitung gespült. Mit diesem Lösungsmittel wird gleichzeitig der nächste Waschvorgang begonnen. Anschließend wird die Kanüle in einer Kanülspülposition abgespült.

Für die Abtrennung des Peptids von Harz wird z.B. Trifluoressigsäure über Arm 1 in die Wells eingebracht.

Nach erfolgter Abspaltung wird mit der Absaugkanüle die Lösung abgesaugt und in eine zweite Microtiterplatte überführt, aus der dann die Aufarbeitung erfolgt.

Wie oben erwähnt worden ist, kann die Absaugkanüle mit einem Filter versehen sein. Dieses Filter ist am unteren Ende der Kanüle angebracht und verhindert das Absaugen und Mitreißen von Harz. Zweckmäßig kann das Filter aus einem Edelstahldrahtnetz bestehen, das z.B. mit einem Löttring befestigt wird. Eine andere Möglichkeit besteht darin, eine Metallsinterplatte oder Keramiksinterplatte in die Öffnung der Kanüle einzupassen. Wird eine Kanüle ohne Filter verwendet, so kann durch langsames Absaugen das Mitreißen und Absaugen von Harz weitgehend vermieden werden. Der Zeitbedarf für das Absaugen steigt dadurch jedoch erheblich.

Die Außenseite der Absaugkanüle wird nach jedem Absaugvorgang mit Lösungsmittel gespült. Das erfolgt zweckmäßig durch die Zufuhr des Lösungsmittels in einer Zuleitung (Schlauch oder Rohr), die an der Langsseite der Kanüle verläuft und so angebracht ist, daß die Öffnung knapp oberhalb des unteren Endes der Kanüle liegt. Es ist wichtig, daß das Lösungsmittel den ganzen Umfang des unteren Endes der Kanüle umspült.

Arm 2 des Gerätes kann mit einem Kamm anstelle der Absaugkanüle versehen werden. Ein solcher Kamm faßt mehrere Absaugkanülen (meist 4-12 Kanülen) der oben beschriebenen Ausführungsart zusammen. Mit Hilfe eines solchen Kamms können gleichzeitig mehrere Wells bedient werden, was zu einer wesentlichen Zeitersparnis führt.

Im allgemeinen wird DMF oder N-Methylpyrrolidon als Lösungsmittel eingesetzt. Dementsprechend müssen die Wells und die eventuell vorgesehene Spülvorrichtung aus lösungsmittelbeständigem Material gefertigt sein, z.B. aus Polypropylen oder Teflon. In den handelsüblichen Geräten sind die Dosierpipetten und Absaugkanülen aus Edelstahl gefertigt. Dieses Material ist für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet.

Wenn man bei dieser Synthese Pro Peptid eine größere Harzmenge einsetzen will (z.B. 50 mg Harz) müssen Microtiterplatten mit größeren Wells verwendet werden. Diese Microtiterplatten sind genormt und im Handel erhältlich. Sie enthalten dann entsprechend weniger Wells.

Statt eines Zweiarm-Pipettier-Roboters kann auch ein Einarm-Gerät verwendet werden. In diesem Fall muß die Absaugkanüle eine Unterteilung im freien Volumen besitzen. Durch den einen Teil erfolgt die Absaugung der Wasch- und Reagenzlösungen, der andere Teil der Kanüle erfüllt die Funktion des Armes 1 des Zweiarm-Geräts, d.h. dient der Zudosierung der Reagenzlösungen. Der Schutz gegen Absaugen von Harz erfolgt wie beim Zweiarm-Gerät beschrieben. Auch diese Kanüle wird wie oben beschrieben abgespült.

Das Verfahren wird zum Beispiel mit folgenden Mitteln ausgeführt (Mengenangabe pro Well): Ausgangsmaterial ist 10 mg mit Fmoc-Aminosäuren beladenes Harz (Korngröße 200-400 mesh); Fmoc

geschützte Aminosäuren werden in bis zu 10 fachem Überschuß für jeden einzelnen Kupplungsschritt eingesetzt, d.h. 200 µl einer DMF-Lösung von 50 µmol Fmoc-Aminosäure und 50 µmol 1-Hydroxybenzotriazol und 100 µl einer DMF-Lösung von 75 µmol N,N-Dicyclohexylcarbodiimid werden zugegeben; die Kupplungszeit beträgt ca. 1 Stunde. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgt jeweils mittels 300 µl einer 40%igen Lösung von Piperidin in DMF. Die Abspaltungszeit ist ca. 20 Minuten. Die Waschschr

5 werden mit jeweils 300 µl DMF ausgeführt.

Die Abspaltung des fertigen Peptids vom Träger kann in den Wells erfolgen durch manuelle oder automatische Zugabe von 300 µl Trifluoressigsäure (20 Minuten Reaktionszeit). Das Acylieren von freien Gruppen (NH<sub>2</sub>, OH) kann analog durch Zugabe geeigneter Säureanhydride, z.B. Acetanhydrid und Pyridin, erfolgen. Nach Beendigung dieser Umsetzungen wird die Lösung abgesaugt und der Aufarbeitung zugeführt.

Wie aus der obigen Erläuterung deutlich wird, werden alle Schritte der Peptidsynthese in offenen Gefäßen ausgeführt. Durch die erfindungsgemäße Ausführung der Synthese werden die Peptide trotzdem in sehr hoher Reinheit erhalten.

15 Figur 1 zeigt ein Beispiel einer Kanüle für einen Einarm-Pipettier-Roboter: (1) Kanüle; (2) und (3) Zudosierseite bzw. Absaugseite der Kanüle; (4) Schlauch für Zufuhr des Lösungsmittels zur Spülung; (5) Filter.

Das folgende Beispiel zeigt den Ablauf des Verfahrens, wobei der Aufbau eines Peptides in einem Well beschrieben wird. Zu beachten ist die Reinheit des Produktes.

20

Beispiel:

Es wurden 44 verschiedene Undekapeptide mit Hilfe des Tecan-Pipettier-Roboters RSP 5052 synthetisiert. Ausgangsmaterial war jeweils ein über einen Linker an Polystyrol gebundenes Tetrapeptid Fmoc-Arg-(Mtr)-Gln-Arg(Mtr)-Tyr(tBu)-Linker-Polystyrol (Beladung ca. 0.5 mmol/g Harz). 44 mal wurden jeweils 10 mg dieses Harzes in die Wells einer Mikrotiterplatte (5 µmol Peptid) gebracht und die Synthese begonnen. Als Beispiel wird die Synthese von Ac-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-NH<sub>2</sub> beschrieben. Die Synthese der übrigen 44 Peptide verlief analog.

30

Synthesecyclus:

35 300 µl Piperidin (40%) in DMF (5 min)  
300 µl Piperidin (40%) in DMF (20 min)  
10 mal Waschen mit je 300 µl DMF (2 min)  
200 µl einer DMF-Lösung 50 µmolar an Fmoc-Thr(tBu)-OH und 50 µmolar an HOBT  
100 µl einer DMF-Lösung 75 µmolar an DCC (1h)  
40 10 mal Waschen mit je 300 µl DMF (2 min)

Entsprechend wurden gleichkonzentrierte Lösungen von

Fmoc-Ile-OH  
Fmoc-Leu-OH  
Fmoc-Asn-OH  
45 Fmoc-Ile-OH  
Fmoc-Tyr(tBu)-OH  
Fmoc-His(Trt)-OH

in identischen Synthesecyclen verwendet. Die abschließende Acetylierung wurde nach Fmoc-Spaltung wie üblich mit 300 µl einer DMF-Lösung 40 µmolar an Acetanhydrid und Pyridin durchgeführt.

50 Die Abspaltung vom Harz erfolgte mit 300 µl Trifluoressigsäure/1% Anisol 30min, waschen. 5 mal mit je 300 µl Trifluoressigsäure. Die vereinigten Trifluoressigsäurelösungen wurden unter Feuchtigkeitsausschluß 1 h bei 50 °C stehengelassen und die Trifluoressigsäure im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde mit Ether im Ultraschallbad behandelt, Ether dekantiert, der Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. HPLC-Chromatogramm (RP18-Säule) (Fig. 2).

55

Laufmittel A	Wasser/Acetonitril/Trifluoressigsäure 95/5/0.2
Laufmittel B	Wasser/Acetonitril/Trifluoressigsäure 20/80/0.2

5

FAB-Massenspektrogramm: M+H : 1518

## Ansprüche

10

1. Verfahren zur vollautomatischen simultanen Synthese mehrerer Polypeptide nach der Festphasensynthesemethode unter Benutzung eines Pipettier-Roboters, wonach polymeres Trägermaterial, das mit dem Anfangsteil des jeweils gewünschten Peptids beladen sein kann, in den Wells einer Microtiterplatte vorgelegt wird, dann nach der an sich bekannten Festphasensynthesemethode in den Wells die Peptide

15 aufgebaut werden und gewünschtenfalls freie Aminogruppen und/oder Hydroxygruppen der Peptide acyliert werden und/oder anschließend die Peptide von ihrem Trägermaterial abgetrennt werden, indem die für die einzelnen Schritte erforderlichen Reagenzien beziehungsweise Waschflüssigkeiten durch einen oder mehrere Roboterarm(e) mit Kanüle aus den entsprechenden Vorratsbehältern in die Wells eingebracht werden und jeweils nach der benötigten Verweilzeit der Reagenzien beziehungsweise Waschflüssigkeiten die in

20 den Wells oberhalb des Trägermaterials befindlichen Flüssigkeiten durch einen Roboterarm mit Kanüle abgesaugt werden, wobei die einzelnen Schritte des Verfahrens durch das im Computer, der an den Roboter angeschlossen ist, vorgegebene Programm gesteuert werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem jeweils zwischen dem Absaugen der Flüssigkeit und dem Zugeben von Reagenzien die Außenseite der Kanüle gespült wird.

25 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Reagenzien in bis zu 20 fachem Überschuß der stöchiometrisch benötigten Menge eingesetzt werden.

4. Kanüle für einen Pipettier-Roboter, deren oberes Ende an die Dosiervorrichtung des Roboterarmes angeschlossen ist, deren unteres Ende mit einem Filter versehen ist und/oder die mit einer Spülvorrichtung versehen ist, deren oberes Ende an dem Roboterarm angeschlossen ist und deren unteres Ende bis knapp

30 oberhalb des unteren Endes der Kanüle reicht, deren Öffnung so angeordnet ist, daß das untere Ende der Kanüle gespült werden kann.

5. Kanüle nach Anspruch 4, deren Hohlraum durch eine von oben nach unten laufende Trennwand in 2 Teile geteilt ist.

6. Kanülenkamm, bestehend aus mehreren Kanülen nach Anspruch 4 oder 5.

35

40

45

50

55

FIG. 1

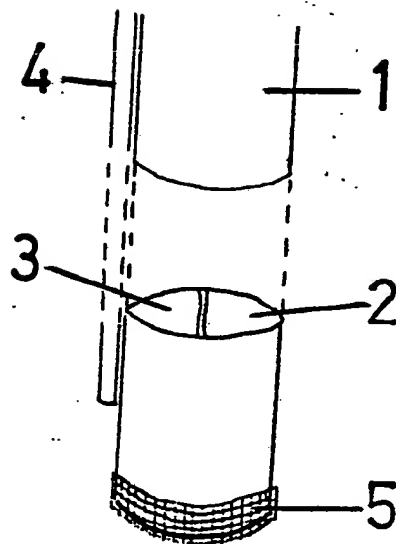
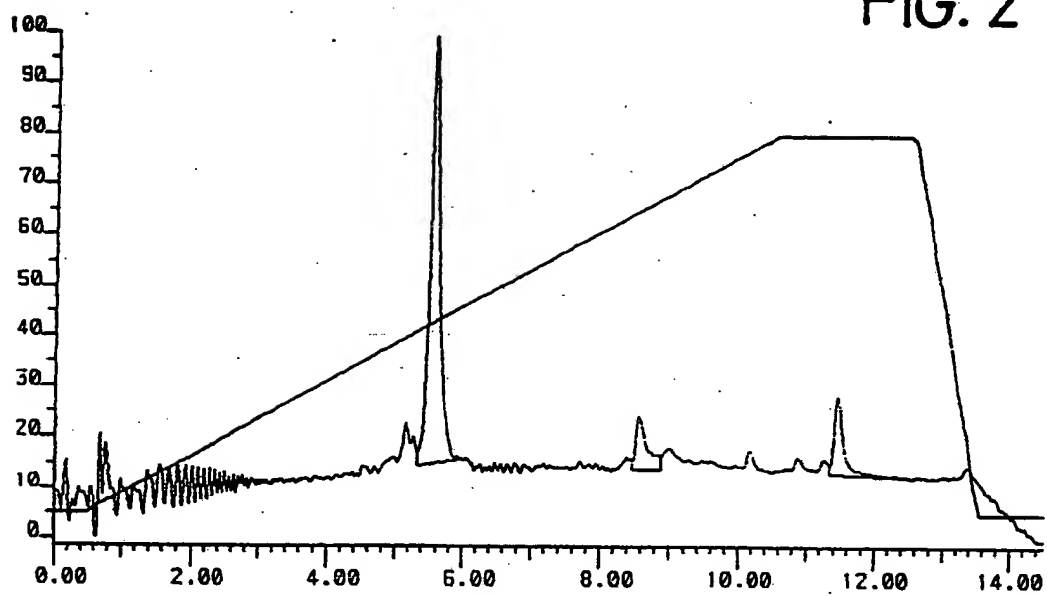


FIG. 2



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**